

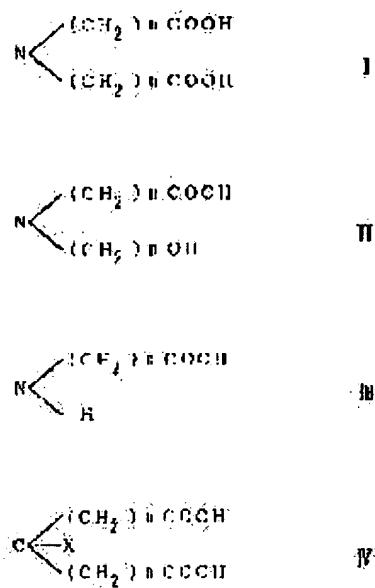
PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **07-067696**
(43)Date of publication of application : **14.03.1995**

(51)Int.CI. **C12Q 1/28**
G01N 21/76

(21)Application number : **05-221018** (71)Applicant : **TOSOH CORP**
(22)Date of filing : **06.09.1993** (72)Inventor : **MITOMA YOSHITAMI
KUMAKURA SACHIKO**

(54) METHOD FOR REDUCING BACK GROUND LUMINESCENCE



(57)Abstract:
PURPOSE: To reduce only back ground luminescence and to enable measurement in high sensitivity by making a specific compound exist in measuring a peroxidase based on luminous reaction comprising a dihydropthalazinedione derivative as a substrate.
CONSTITUTION: Luminescence occurring by treatment of a 2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione derivative (e.g. luminol) with hem or a peroxidase (preferably one derived from horseradish) in the presence of an oxidizing agent (e.g. hydrogen peroxide) is measured in the presence of one or more compounds (e.g. citric acid) which contain a functional group of formula I to formula IV (X is H, OH or COOH; (n) is 1-3) or its salt, does not contain aromatic hydrocarbon containing OH and has chelating action. The measurement is carried out preferably at pH 8-9.5 and a boric acid-based buffering solution is

preferable as the buffer solution. In the case of measuring hem or a peroxidase in an extremely low concentration, a combined use of an enhancer such as 6-hydroxybenzothiazole is preferably.

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-67696

(43)公開日 平成7年(1995)3月14日

(51)Int.Cl.⁶

C 12 Q 1/28
G 01 N 21/76

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数1 O L (全 6 頁)

(21)出願番号

特願平5-221018

(22)出願日

平成5年(1993)9月6日

(71)出願人 000003300

東ソ一株式会社

山口県新南陽市開成町4560番地

(72)発明者 三苦 恵民

神奈川県藤沢市湘南台4丁目26番5-106

号

(72)発明者 熊倉 幸子

神奈川県厚木市緑ヶ丘3丁目2-2-302

(54)【発明の名称】 バックグランド発光の低減法

(57)【要約】

【目的】2, 3-ジヒドロー-1, 4-フタラジオン誘導体及び酸化剤を用いて酸化触媒であるヘム又はペルオキダーゼをそれらの触媒作用による発光反応に基づいて測定する場合の、バックグランド発光の低減法の提供。

【構成】特定の化学式で示される官能基又はその塩を構造中に含み、且つ水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含まない、キレート作用を有する化合物の1種以上の共存下で測定を実施することにより、ヘム又はペルオキダーゼの測定におけるバックグランド発光を低減する。

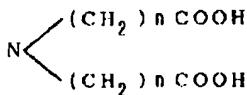
1

【特許請求の範囲】

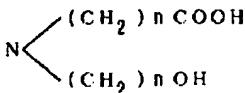
【請求項1】 2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジオニン誘導体を酸化剤存在下、ヘム又はペルオキシダーゼで処理することで生じる発光を、以下の化式1～4（但しXはH、OH、COOH、n=1～3）で示される官能基又はその塩を構造中に含み、且つ水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含まない、キレート作用を有する化合物の1種以上の共存下で測定することを特徴とする、ヘム又はペルオキシダーゼの測定におけるバックグラウンド発光の低減法。

10

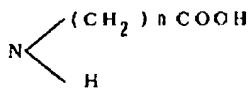
【化1】



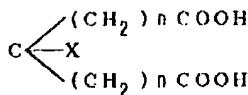
【化2】



【化3】



【化4】



【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジオニン誘導体及び酸化剤を用いて、酸化触媒であるヘム又はペルオキダーゼをそれらの触媒作用による発光反応に基づいて測定する場合の、バックグラウンド発光の低減法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】生体中の極微量物質の定量には、近年酵素免疫測定法（EIA）が用いられるようになってきたが、標識酵素の測定には蛍光基質を用いることが主流となっている。しかし蛍光物質の測定では、励起光の影響等で必ずしも高感度測定が容易ではなく、より高感度な測定が可能な発光基質を用いた酵素免疫測定法（CLEIA）が提案されている。

【0003】CLEIAに用いられる酵素として、アルカリフェオスマターゼやペルオキシダーゼ等が挙げられるが、アルカリフェオスマターゼに使用される発光基質の場合、ジオキセタン構造を含む発光基質の磷酸基を加水分解する事により不安定化し、分解する際に発光するように設計されている。

【0004】ペルオキシダーゼの場合、単独でルミノー

10

ルを過酸化水素等の酸化剤と反応させると、酵素の絶対量として数フェントモル程度までは短時間の発光が認められるが、それ以下の量になるとバックグラウンド発光に隠されてしまい、測定が難しい。この問題に対しThorpe等は、フェノール誘導体やヒドロキシベンゾチアゾール等の化合物（エンハンサー）を上記の系に添加する事により発光が著しく増強し、且つ発光が長時間持続する事を報告している（Methods in Enzymology 133, p 331-353, 1986年）。これら一連のエンハンサーは、酸化剤とルミノールを混合した際に発生するバックグラウンド発光を低下させると同時に、ペルオキシダーゼ等の触媒による発光を増強する効果があり、これによりペルオキシダーゼは数10アトモル程度まで測定できるようになっている。ペルオキダーゼを標識に使ったCLEIAにおいては、この増強反応を利用して従来より高感度に種々の測定項目が定量できるようになった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】前述のようなアルカリフェオスマターゼ測定に使用される発光基質の場合、アルカリフェオスマターゼの至適pHにおいて、これら発光基質の磷酸エステルの非酵素的な加水分解が起こりやすく、これに由来するバックグラウンド発光が生じやすいという課題がある。バックブランド発光が生じると、微量のアルカリフェオスマターゼに由来する微小な発光がバックグラウンドと区別できないため、測定感度を高めることができないのである。

【0006】またペルオキシダーゼ測定に使用される発光基質やエンハンサーについても、微量のペルオキシダーゼを測定しようとする場合には前記アルカリフェオスマターゼの場合と同様の課題がある。例えエンハンサーを添加しても、依然バックグラウンド発光が高いレベルにあるため、そのレベル以下の発光はとらえる事が出来ないためである。

【0007】このように、この高いバックグラウンド発光を低く抑える方法の開発が高感度測定を達成するためには不可欠であった。

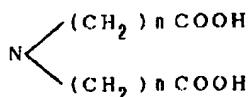
【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、ルミノール、酸化剤及びエンハンサーからなる系におけるバックグラウンド発光の低減法について鋭意研究した結果、本発明を完成了。すなわち本発明は、2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジオニン誘導体を酸化剤存在下、ヘム又はペルオキシダーゼで処理することで生じる発光を、以下の化式5～8（但しXはH、OH、COOH、n=1～3）で示される官能基又はその塩を構造中に含み、且つ水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含まない、キレート作用を有する化合物の1種以上の共存下で測定することを特徴とする、ヘム又はペルオキシダーゼの測定におけるバックグラウンド発光の低減法である。以下本発明を詳細に説明する。

3

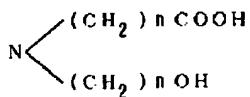
【0009】

【化5】



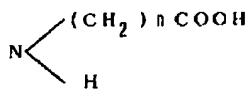
【0010】

【化6】



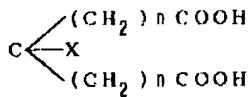
【0011】

【化7】



【0012】

【化8】



【0013】ルミノールに代表される2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジオン誘導体と過酸化水素等の酸化剤を弱アルカリ性の溶液中で混合すると、ヘムやペルオキシダーゼといった酸化触媒を添加しなくとも、あるレベルの発光が認められる。これが本発明でいうバックグラウンド発光である。このバックグラウンド発光は、反応系内に微量に存在する金属イオンに起因するものであることが確認された。従って本発明は、前記4種類の官能基又はその塩を構造中に含み、且つ水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含まない、キレート作用を有する化合物の1種以上を共存させることによりバックグラウンド発光を低減するものである。

【0014】このような性質を持つ化合物としては、例えば、trans-1, 2-Diaminocyclohexane-N, N, N', N'-tetraacetic acid monohydrate 及びその塩、N, N-Bis(2hydroxyethyl)glycine及びその塩、1, 3-Diamino-2-hydroxypropane-N, N, N', N'-tetraacetic acid 及びその塩、Diethyl enetriamine-N, N, N', N', N'-pentaacetic acid 及びその塩、Ethylenediamine-N, N'-diacetic acid 及びその塩、Ethylenediamin-N, N'-dipropionic acid, dihydrochloride及びその塩、N-(2-Hydroxyethyl)ethylenediamine-N, N', N'-triacetic acid 及びその塩、O, O'-Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-N, N, N', N'-tetraacetic acid 及びその塩、1, 6-Hexamethylmethylenediamine-N, N, N', N'-tetraacetic acid 及びその塩、N-(2-Hydroxyethyl)iminodiacetic acid 及びその塩、Iminodiacetic acid 及びその塩、1, 2-Diaminopropane-N, N, N', N'-tetraacetic acid 及びその塩、Nitrilotriacetic acid 及びその

塩、Nitrilotriporionic acid 及びその塩、Triethylenetetramine-N, N, N', N', N'', N'''-hexaacetic acid 及びその塩、N-(2-acetoamido)iminodiacetic acid 及びその塩、O, O'-Bis(2-aminophenyl)ethyleneglycol-N, N, N', N'-teraacetic acid 及びその塩、クエン酸及びその塩等が例示できる。

【0015】系内に添加する化合物の濃度としては、0.01mMから5mM、好ましくは0.05mMから1.0mMが良い。これ以上の濃度で使用する場合、ヘムやペルオキシダーゼ等の触媒活性に由来する発光を阻害する場合があるため、実施に先立ち、予備的実験を行い、添加濃度条件を決定しておくと良い。

【0016】前記のような官能基を有する化合物であっても、Ethylenediaminehydroxyphenylacetic acid 及びその塩のように水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含むキレート剤は、ヘムやペルオキシダーゼ等の触媒活性に由来する発光を阻害する場合がある。

【0017】本発明で用いられる2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジオン誘導体として、例えばルミノール及びその誘導体、イソルミノール及びその誘導体、7-Dimethylaminonaphthalene-1, 2-dicarboxylic acid hydrazide等が例示できる。酸化剤としては、例えば、過酸化水素、過ほう酸ソーダ等が例示できる。

【0018】バックグラウンド発光のみを低減する目的ではエンハンサーを加える必要がないが、バックグラウンド発光がより低い事が望ましい状況、即ち極低濃度のヘム又はペルオキシダーゼの測定を行う場合、エンハンサーを併用すると効果的である。エンハンサーは、例えばp位置換フェノール誘導体(pヨードフェノール、4-フェニルフェノール他)、2-ヒドロキシケイヒ酸、ホタルルシフェリン及びその誘導体、6-ヒドロキシベンゾチアゾール、4-(4-ヒドロキシフェニル)チアゾール等を例示できる。

【0019】本発明は、種々の起源のペルオキシダーゼについて適用可能であるが、特に西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼに好適である。西洋ワサビペルオキシダーゼのアイソマーの中では、特に塩基性アイソマーに好適であり、この時のpHとしては弱アルカリ性、pH8.0からpH9.5が良く、緩衝液としてはトリスヒドロキシメタン等のアミン系又はほう酸系等が好ましい。

【0020】

【発明の効果】本発明によれば、系内のバックグラウンド発光を低減し得、しかも酸化触媒に由来する発光は阻害することのない、即ちバックグラウンド発光のみを特異的に低減したヘム又はペルオキシダーゼの測定が可能である。本発明を用いればバックグラウンド発光が従来に比べて低く抑えられるため、従来バックグラウンド発光に埋もれていたヘム又はペルオキシダーゼによるシグナル発光を高感度に測定できる。また本発明は、ペルオキシダーゼ等を抗体の標識物として使用した、増強発光エンザイ

ムイムノアッセイ (Enhanced-CLEIA) に応用することが可能である。この場合、単にペルオキシダーゼ等の測定にとどまらず、種々の生体微量物質の高感度測定に応用できる。

【0021】

【実施例】以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は実施例のみに限定されるものではない。

【0022】実施例1

0.2mM 4-フェニルフェノール、1.0mM 過酸化水素、0.5mM ルミノールNa塩及び0.1mM の表1に示した化合物を含む0.1Mトリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 溶液を調製し、バックグランド発光 (カウント/分) を測定した。比較のため、4-フェニルフェノール、過酸化水素、ルミノールNa塩以外は含まない0.1Mトリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 溶液を調製し、同様にバックグランド発光を測定した。発光測定は市販の測定装置 (アロカ社製B L R - 30 1) を使用し、それぞれ200 μl の試料について、試薬調製後30秒から1 分間の発光量を積算した。結果を表1に示す。なお表1において、CyDTA はTrans-1,2-Diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, monohydrate を、DHEGはN,N-Bis(2hydroxyethyl)glycineを、EDDAは*

10

20

【表1】

*Ethylenediamine-N,N'-diacetic acidを、EDTAはEthylene diamine-N,N,N',N'-tetraacetic acidを、EGTAはO,O'-Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acidを、IDAはIminodiacetic acidを、NTAはNitrilotriacetic acidを、Arg.はアルギニンを、Asp.はアスパラギン酸を、Cys.はシスチンを、Glu.Aはグルタミン酸を、His.はヒスチジンを、Orn.はオルニチンを、Tyr.はチロシンを、2,3DCPyri.は2,3-Dicarboxypyridineを、NM2,3DCPyri.は1,2,3-dicarboxypyridineを、2,3DCPyra.は2,3-Dicarboxypyridineをそれぞれ示す。これら化合物のうち、CyDTA、DHEG、EDDA、EDTA、EGTA、IDA、NTAは本発明の化合物としての性質を満たすものの、すなわち前述の官能基又はその塩を構造中に含み且つ水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含まないキレート作用を有する化合物である。

【0023】表1からは、CyDTA、DHEG、EDDA、EDTA、EGTA、IDA又はNTAを添加した場合に、無添加又はその他を添加した場合と比較して明らかにバックグランド発光が低減されていることがわかる。

20

【表1】

試薬名	バックグランド発光量 (counts/min.)	試薬名	バックグランド発光量 (counts/min.)
無添加	1,820	Cys.	1,295
CyDTA	197	Glu.A	1,544
DHEG	346	His.	1,535
EDDA	649	Orn.	1,889
EDTA	799	Tyr.	1,071
EGTA	272	アントラニ酸	1,422
IDA	465	2,3DCPyri.	11,784
NTA	205	NM2,3DCPyri.	3,317
Arg.	1,713	2,3DCPyra.	2,734
Asp.	1,361		

【0025】実施例2

実施例1においてバックグランド発光の低減が認められた化合物、CyDTA、DHEG、EDDA、EDTA、EGTA、IDA又はNTAについて、これら化合物がペルオキシダーゼの触媒作用を妨害しないか否か試験した。

40 Aを調製し、250 アトモル (10μl) の西洋ワサビペルオキシダーゼ溶液を添加した。添加後30秒から1 分間の発光を実施例1と同様に測定した。結果を表2に示す。表2から、CyDTA、DHEG、EDDA、EDTA、EGTA、IDA又はNTAがバックグランド発光の低減効果を有し、しかもペルオキシダーゼの酸化作用を妨害しないことがわかる。

【0026】0.2mM 4-フェニルフェノール、1.0mM 過酸化水素、0.5mM ルミノールNa塩及び0.1mM の表2に示した化合物を含む0.1Mトリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 溶液

40

【表2】

【表2】

試薬名	バックグランド発光 (counts/min.)	^{ペルオキシダーゼ} 添加時の 発光量 (Counts/min.)	S/N比
無添加	1,820	253,363	139.2
CyTDA	197	250,771	1272.9
DHEG	346	215,528	623.6
EDDA	649	239,032	368.3
EDTA	799	252,844	316.5
EGTA	272	231,688	851.8
IDA	465	249,905	537.4
NTA	205	240,664	173.9

【0028】実施例3

表3に示した化合物を0.1mM又は1mM濃度で使用した以外は実施例1と同様の操作を行い、バックグランド低減効果を調査した。結果を表3に示す。なお表3においてADAはN-(2-acetoamido)iminodiacetic acidを、DSはDextran Sulfatesodiumを、MOPSは3-(N-Morpholino)Propane-sulfonic Acidを、2,2Bipyは2,2Bipyridylを、o-Phnはo-Phenanthrolineをそれぞれ示す。なお、表3において、ADA又はクエン酸は本発明の化合物としての性*20

*質を満たすものすなわち前述の官能基又はその塩を構造中に含み、且つ水酸基を有する芳香族炭化水素を構造中に含まないキレート作用を有する化合物である。

【0029】表3からは、ADA、クエン酸又はDSを添加した場合に、無添加又はその他を添加した場合と比較して明らかにバックグランド発光が低減されていることがわかる。

【0030】

【表3】

試薬名	バックグランド発光量 (Counts/min.)	試薬名	バックグランド発光量 (Counts/min.)
無添加	3,524	クエン酸 0.1mM	250
クエン酸 0.1mM	3,978	1.0mM	79
1.0mM	4,375	酒石酸 0.1mM	4,600
シウ酸 0.1mM	4,040	1.0mM	1,821
1.0mM	1,071	MOPS 0.1mM	9,908
ADA 0.1mM	569	1.0mM	33,763
1.0mM	364	2,2Bipy 0.1mM	9,174
DS 0.1mM	508	o-Phn. 0.1mM	10,207

【0031】実施例4

実施例3において使用したADA、DS及びクエン酸について、これら化合物が実際にペルオキシダーゼの触媒作用を妨害しないか否か試験した。

【0032】0.2mM 4-フェニルフェノール、1.0mM過酸化水素、0.5mM ルミノールNa塩及び0.1mMの表4に示した化合物を含む0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.5)溶液を調製し、250アトモル(10μl)の西洋ワサビペルオ

キシダーゼ溶液を添加し、添加後30秒から1分間の発光

40 【表4】

を実施例1と同様に測定した。結果を表4に示す。

【0033】表4から、本発明の化合物であるADA及びクエン酸はバックグランド発光の低減効果を有し、かつペルオキシダーゼの酸化作用を妨害しないことがわかるが、DSではバックグランド発光の低減効果が認められるもののペルオキシダーゼの酸化作用をも妨害していることがわかる。

【0034】

薬名	バックグランド発光量 (Counts/min.)	^{ペルオキシダーゼ} 添加時の 発光量 (Counts/min.)	S/N比
無添加	3,524	253,363	71.9
ADA 0.1mM	569	171,911	302.1
1.0mM	364	115,223	316.5
DS 0.1mM	508	4,860	9.6
クエン酸 0.1mM	250	211,125	844.5
1.0mM	79	189,262	2395.7

【0035】実施例5

甲状腺刺激ホルモン(TSH)に対するモノクローナル抗体をペプシン消化してF(ab)'2化した後、ゲルろ過及び疎水クロマトグラフにより精製し、ジチオスレイトールにより還元してFab化した。Fab化フラグメントはゲルろ過により精製し、これにSMCC(Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)で修飾した西洋ワサビペルオキシダーゼを加え37℃で1時間反応させた後、ゲルろ過により酵素標識抗体(コンジュゲート)画分を分取した。

【0036】分取したコンジュゲートはUV280nmの吸収を測定した後、4℃にて保存した。反応容器に抗TSH Fab化抗体を固相化した磁性ビーズ($\phi=1.4\text{mm}$)12個を入れ、これにTSHゼロ血清又は既知濃度(4.81 $\mu\text{IU}/\text{ml}$)血清100 μl を加え、37℃5分間攪拌しながら反応させた後、B/F分離を行い、0.1M NaCl、50mMトリス緩衝液、0.5%Tween 20(pH8.5)を含む溶液で洗浄し、先に調製したコンジュゲート(希釈液にて200倍希釈したもの)100 μl 加え、更に37℃10分間反応させ

た。次いでB/F分離後洗浄を5回行った後、発光検出器(アロカ社製BLR-301)にセットし、0.2mM 4-Phenylphenol、1.0mM 過酸化水素、0.5mM ルミノールNa塩、0.1mM CyDTA、0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.5)を含む発光試薬200 μl を加え、添加後30秒から1分間の発光量を実施例1と同様にして積算した。なお測定は、同一の被検液について5回ずつ行った。測定結果(平均値、標準偏差、変動値、2SD法による検出下限界濃度を表5に示す。

【0037】表5からCyDTA添加系のS/N比(陽性血清での発光量/ゼロ血清の発光量)は851であるのに対し、CyDTA非添加系でのS/N比は147であり、S/N比的に約6倍改善されたことがわかる。またCyDTAを添加した場合の検出下限界濃度は0.004であるのに対し、これを添加しなかった場合では0.017であり、検出下限界濃度も約6倍改善されたことがわかる。

【0038】

【表5】

	発光量(counts/min)			
	CyDTA添加	CyDTA無添加	CyDTA添加	CyDTA無添加
TSH濃度($\mu\text{IU}/\text{ml}$)	陰性血清 0	陰性血清 0	陽性血清 48.1	陽性血清 48.1
平均値	131	789	111,458	116,279
標準偏差	47	201	7,697	6,312
変動値(%)	36	25	7	5
検出下限界濃度	-	-	0.004	0.017